

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07D493/04 A61K 31/34

A61P 35/00

//(C07D493/00, 307: 00,

303: 00)

## [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99111660.7

[45] 授权公告日 2002 年 12 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1095844C

[22] 申请日 1999.8.20 [21] 申请号 99111660.7

[30] 优先权

[32] 1999.4.16 [33] CN [31] 99105796.1

[73] 专利权人 成都地奥制药集团有限公司

地址 610041 四川省成都市高新区高新大道创业  
路 26 号

共同专利权人 W&K 国际公司

[72] 发明人 王大元 高小平 李文武 李伯刚

[56] 参考文献

CN1052860 1991. 7.10 C07D493/22

CN1052861 1991. 7.10 C07D493/22

C. A. 116:136234 1992. 4. 6 MA PENGCHENG

审查员 穆森昌

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

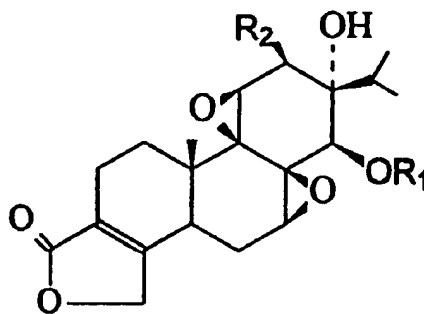
代理人 严 舫

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 3 页

[54] 发明名称 雷公藤内酯醇衍生物, 制备方法及其应用

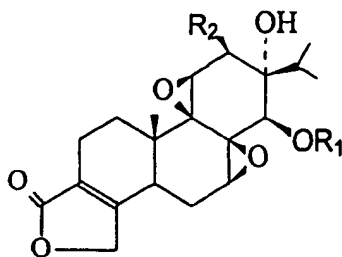
[57] 摘要

1. 一种雷公藤内酯醇衍生物, 其结构式为: 其中,  $R_1$  是 H, 含有 1 - 4 个碳原子的烷基, - Ac, - C(=O)  $(CH_2)_nCO_2H$ , 或者是氨基酸基, 其中,  $n$  为 1 - 4 的整数,  $R_2$  是 - SCN, 或者 - NCS。本发明的化合物对某些肿瘤具有选择性抑制作用。



ISSN 1008-4274

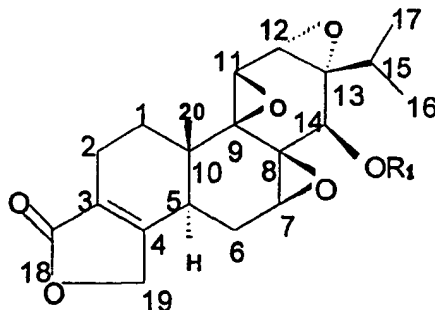
1. 一种雷公藤内酯醇衍生物，其结构式为：



其中， $R_1$  是 H, 含有 1-4 个碳原子的烷基，-Ac,  $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ , 或者是氨基酸基，其中， $n$  为 1-4 的整数， $R_2$  是 -SCN, 或者 -NCS。

2. 按照权利要求 1 所述的化合物，其特征在于， $R_2$  是 -SCN;  $R_1$  是 H。

3. 一种生产权利要求 1 所述的化合物的方法，包括将如下式所示的雷公藤内酯醇在加热条件下与硫氰酸反应，



其中， $R_1$  是 H, 含有 1-4 个碳原子的烷基，-Ac,  $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ , 或者是氨基酸基，其中， $n$  为 1-4 的整数。

4. 按照权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该反应是在有机溶剂中在 65-87°C 的条件下进行的。

5. 按照权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的有机溶剂是叔丁醇。

6. 权利要求1或2所述的化合物在制备治疗癌症的药物中的应用。
7. 按照权利要求6所述的应用，其特征在于，所述的癌症是肾癌，乳腺癌，肺癌，恶性黑色素瘤，结肠癌或卵巢癌。
8. 一种药物组合物，它含有抑制癌细胞生长有效量的权利要求1或2所述的化合物以及药物上可接受的载体。
9. 按照权利要求8所述的组合物，其特征在于，所述的癌细胞来自乳腺癌，肺癌，肾癌，恶性黑色素瘤，结肠癌或卵巢癌。
10. 一种药物组合物，它含有抑制癌细胞生长协同有效量的权利要求1或2所述的化合物和 bcl-2反义寡核苷酸，以及药物上可接受的载体。
11. 按照权利要求10所述的组合物，其特征在于所述的癌细胞来自乳腺癌，肺癌，肾癌，恶性黑色素瘤，结肠癌或卵巢癌。

## 雷公藤内酯醇衍生物制备方法及其应用

本发明涉及一种雷公藤内酯醇衍生物，其生产方法，在生产治疗癌症的药物中的应用，以及含有这种化合物的药物组合。

雷公藤具有抗癌作用已为国内外学者所证实。1972年Kuphchan (1) 就从雷公藤中分离获得含环氧的二萜化合物，即雷公藤内酯醇 (triptolide)，用于抗肿瘤研究。雷公藤内酯醇在0.2及0.25mg / kg ip时，能延长L<sub>615</sub>白血病小鼠的存活时间，且存活小鼠经数次攻击不致白血病。在1ng / ml 剂量时可抑制人鼻咽癌KB细胞的体外增殖（张覃沐，陈正玉，林晨，雷公藤内酯醇抗肿瘤作用及对小鼠免疫功能的影响，中国药理学报，1981；2（2）：128），在抑制乳腺癌和胃癌细胞集落形成时，其强度与抑制人白血病HL-60细胞相近，IC<sub>50</sub>为0.504-1.22μg / L。对人宫颈癌Hela细胞动力学影响的实验发现，雷公藤内酯醇对时相同步化细胞均有杀伤作用，并对S期细胞敏感。实验还证明，雷公藤内酯醇在抗肿瘤的同时，能抑制RNA及蛋白质的合成，并选择性地使磷酸果糖激酶上的巯基失活，抑制肝糖元合成，使RNA聚合酶失活，干扰DNA的复制（许建华，李长春，黄自强，雷公藤内酯醇对Hela细胞的细胞动力学影响，中国药理学报，1989；10（6）：550）。由于雷公藤环氧二萜内酯化合物具有较强的生物活性和应用前景，引起研究者的广泛兴趣，对它们的化学合成、结构修饰以及生物活性研究至今持续不断（Berchtold GA et al, J Am Chem Soc, 1980, 102: 1200; Tamelen EE et al, J Am Chem Soc, 1982, 104: 1785）。早在80年代初期，就已成功地化学合成了雷公藤内酯醇，但由于反应路线长，步骤多且反应苛刻，最终获得的目标产物仅有理论研究价值。于德泉等（于德泉，张东明，王淮滨，梁晓天，雷公藤内酯醇的结构修饰，药学学报，1992，27（11）：830）对雷公藤内酯醇作了大量的化学结构修饰，曾获得许多有价值的产物。雷公藤内酯醇是雷公藤中的主要有效成分之一，尽管用量小，但其生物活性有效剂量接近其LD<sub>50</sub>，临床仍表现出相当毒性，故妨碍了进一步开发和临

床应用。另外从目前的文献报道来看，国内外对雷公藤环氧二萜类化合物的生物活性研究仍是大部分集中在免疫抑制上，而对它们的抗肿瘤作用的研究不是很多，其原因是与其它具有免疫抑制作用的天然产物相比，雷公藤环氧二萜类化合物更具特色。但近期的研究表明，自身免疫系统性疾病如风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、红斑性狼疮等与肿瘤的生长一样，都涉及到病变的新生血管生成，这些病都可称之为“血管生成性疾病”。因此，作为治疗风湿性关节炎和其它新生血管生成疾病的化合物也可能表现出对肿瘤的抑制作用（Folkman J, Nature Med, 1995, 1: 27）。

分子肿瘤学研究所取得的进展为治疗肿瘤提供了许多如癌基因、抑癌基因以及其它可供利用的抗癌药物作用的靶点，如能找到药物攻击癌细胞的靶点尤其拮抗癌基因及其异常表达产物的药物，对抗肿瘤药物的研究和发展将具有重要的价值。凋亡及与凋亡有关的癌基因是抗肿瘤药物筛选的重要靶点。雷公藤内酯醇可诱导淋巴细胞凋亡的研究（Yang YL, et al, Immunopharmacology 1998; 40: 139）表明在诱导凋亡的早期雷公藤内酯醇激活凋亡相关蛋白酶。T12对多种肿瘤细胞有很强的杀伤作用，毒性也远远低于雷公藤内酯醇；从分子水平研究T12的作用机制也发现，该化合物诱导肿瘤细胞凋亡，并引发凋亡相关蛋白酶的激活，改变凋亡程序或凋亡程序的基因产物即降解Bcl-2癌蛋白，T12引发的这种活性明显强于雷公藤内酯醇，使它有希望成为一种新型、低毒的抗肿瘤药物。

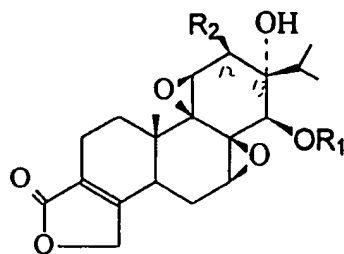
本发明的一个目的是提供一种毒性低，临床应用价值高的雷公藤内酯醇衍生物。

本发明的又一个目的是提供一种本发明的雷公藤内酯醇衍生物的运用。

本发明的另一个目的是提供一种生产本发明的雷公藤内酯醇衍生物的方法。

本发明的再一个目的是提供一种含有本发明的雷公藤内酯醇衍生物的药物组合物。

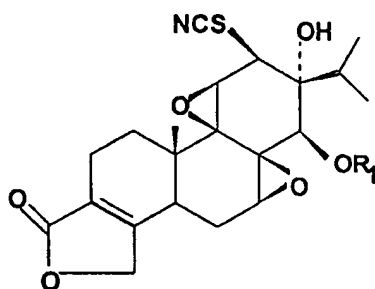
本发明提供了一种雷公藤内酯醇衍生物，其结构式为：



其中, R<sub>1</sub>是H, 含有1-4 个碳原子的烷基, -Ac -C(=O) (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H, 或者是氨基酸基, 其中, n为1-4的整数; R<sub>2</sub>是-SCN, -NCS。由于分子内重排, -SCN和-NCS之间可能会发生转换。

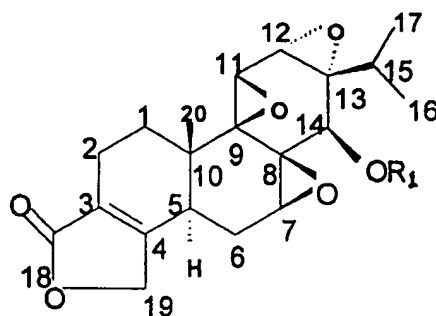
在本发明的化合物中, 优选R<sub>2</sub>是-SCN; R<sub>1</sub>是H。

于德泉等用不同试剂打开雷公藤内酯醇的12, 13-环氧而得到包括12-位卤素(Cl, Br)的一系列雷公藤内酯醇衍生物。12-位为卤素的雷公藤内酯醇衍生物进入体内后, 在酶促作用下, C12,13-可能重新关环, 回复为前体化合物雷公藤内酯醇, 从而再度表现前体化合物雷公藤内酯醇的毒性。本发明用雷公藤内酯醇为原料, 在温和反应条件下, 用硫氰酸铵进行C-12, 13的开环反应, 获得新型高抗肿瘤活性, 低毒的12-β-硫氰酸基-13-α-羟基雷公藤内酯醇(以下简称T12), 其结构式如下:



其中, R<sub>1</sub>是H, 含有1-4 个碳原子的烷基, -Ac -C(=O) (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO<sub>2</sub>H, 或者是氨基酸基, 其中, n为1-4的整数。R<sub>1</sub>基团可通过公知的方法加入。

本发明还提供了一种生产上述化合物的方法，包括将如下式所示的结构在加热条件下与硫氰酸反应，



其中， $R_1$ 是H，含有1-4个碳原子的烷基， $-Ac -C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ ，或者是氨基酸基，其中， $n$ 为1-4的整数。

本发明的上述方法中，所述反应最好是在有机溶剂中在65-87°C的条件下进行的。所述的有机溶剂最好是叔丁醇。

本发明还提供了一种上述化合物在制备治疗癌症的药物中的应用。

在上述应用中，所述的癌症可以是乳腺癌，肺癌，肾癌，恶性黑色素瘤，结肠癌和卵巢癌。而对肾癌，卵巢癌，乳腺癌，结肠癌和恶性黑色素瘤具有更好的效果。

本发明还提供了一种药物组合物，它含有抑制癌细胞生长有效量的本发明的化合物以及药物上可接受的载体。

在上述的药物组合物中，所述的癌细胞可以是乳腺癌，肺癌，肾癌，恶性黑色素瘤，结肠癌和卵巢癌。最好是肾癌，卵巢癌，乳腺癌，结肠癌和恶性黑色素瘤细胞。

本发明还提供了另外一种药物组合物，它含有抑制癌细胞生长协同有效量的本发明的化合物和bcl-2反义核苷酸，以及药物上可接受的载体。

附图简要说明：

图1表示T12诱导细胞凋亡的DNA降解状态。

图2表示T12诱导HL-60细胞和Bre-01细胞Bcl-2发生降解。

图3表示T12诱导bcl-2发生降解的强度并与其它三种化合物的比较。

图4表示本发明的化合物与反义核酸协同作用Col-06细胞的结果。


## 实施例1

12-β-硫氰酸基-13-α-羟基雷公藤内酯醇的制备方法;

取3.6g(0.01mol) 雷公藤内酯醇溶于400ml 叔丁醇中, 于50°C下搅拌加热溶解, 待完全溶解后, 加入11.4g (0.15mol) 硫氰酸铵。升温至80°C, 反应24hrs, 反应毕。反应液加入400ml乙酸乙酯, 有机层用饱和氯化钠水溶液洗3次, MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤, 于60°C下蒸除溶剂, 剩余物加入丙酮溶解。TLC检测, 氯仿: 甲醇 (95: 5) 展开, T<sub>12</sub> 为主要点, 含少量T和其它副产物。丙酮液加入10g 100-200目硅胶拌样, 除尽丙酮, 200-300目硅胶柱层析分离, 先用氯仿洗脱除尽T, 再换用氯仿: 甲醇 (95:5) 洗脱, TLC跟踪检测, 收集T<sub>12</sub>馏分, 合并T<sub>12</sub>。减压蒸除溶剂后加入少量丙酮溶解, 放置, 析出T<sub>12</sub> 粒状结晶3.77 g, 收率90%  
Mp:265-266°C. R<sub>f</sub>值为: 0.15(CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 95:5), 显色剂为Kedd's试剂, 呈紫红色。

元素分析 C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NSO<sub>6</sub>, 计算值%: C, 60.14. H, 6.01. N, 3.34. 实测值%: C, 59.85. H, 5.93. N, 3.26.  $[\alpha]_D^{25}$  -114.06°C (acetone, 4.17mg/ml).

IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3450, 3000, 2152, 1739, 1674, 1441, 1032, 980.

MS m/z(%): 419(M<sup>+</sup>, 13), 404(-CH<sub>3</sub>, 14.5), 361(-, 13), 343(-H<sub>2</sub>O, 13), 271(14), 241(23), 151(48), 137(89), 72(91), 61(100).

<sup>1</sup>HNMR, δppm: 0.8(3H, d, J=6.77Hz, 16-CH<sub>3</sub>), 0.95(3H, s, 20-CH<sub>3</sub>), 0.99(3H, d, J=6.88Hz, 17-CH<sub>3</sub>), 1.28(1H, m, 1-αH), 1.45(1H, m, 1-βH), 1.85(1H, t, J=14.17Hz, 6-βH), 2.0(1H, m, 2-H), 2.18(1H, m, 2-H), 2.20(1H, m, 6-αH), 2.25(1H, m, 15-H), 2.67(1H, m, 5-H), 3.0(1H, d, J=4.4Hz, 14-H), 3.35(1H, m, 7-H), 3.75(1H, d, J=5.61Hz, 11-H), 3.90(1H, d, J=5.87Hz, 12-H), 4.85(2H, m, 19-H), 5.0(1H, s, 13-OH), 5.45(1H, d, J=4.2Hz, 14-OH);



$^{13}\text{C}$ NMR,  $\delta\text{ppm}$ :14(16-C),15.5(20-C), 16(17-C), 17(2-C), 22.5(6-C), 29(15-C), 30(1-C), 35(10-C), 39(5-C), 51(11-C),57.5(12-C), 60.5(8-C), 61.5(7-C), 67(9-C), 70.5(19-C), 74(14-C), 76.5(13-C),115(SCN), 123(3-C), 162(4-C), 173(18-C)。

## 实施例2

### SRB法测定T12对20种不同肿瘤细胞的抑制作用

体外培养肿瘤细胞已成为筛选抗癌药物和进行研究的重要手段。过去常用的手段是利用动物如小鼠白血病/淋巴瘤细胞系,但人与小鼠的细胞对药物的反应有明显的差别,因此近年来大多已改用人体肿瘤细胞系进行体外抗肿瘤试验。本发明的抗肿瘤试验应用了六种细胞系,分别为肺癌(Lu-06)、乳腺癌(Bre-01)、卵巢癌(Ov-01)、肾癌(Re-01)、结肠癌(Col-06)、恶性黑色素瘤(Mel-08)。

采用美国国立癌症研究所建立的SRB抗癌药物筛选方法 (Skehan P, Storeng R, Scudiero D et al, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1107) 对本发明进行体外抗肿瘤测试,并与其先导化合物雷公藤内酯醇 (T) 和另一雷公藤内酯醇衍生物 8-OH雷公藤内酯醇 (高活性免疫抑制剂,以下简称T8, 见Jung, 1/1999 PCT/US98/08562, WO98/52933)以及抗肿瘤植物合成药紫杉醇进行了比较。测试方法如下:

将肿瘤细胞培养在含 5%小牛血清的RPMI1640培养基中,内含适量青、链霉素和谷氨酰胺,在5%CO<sub>2</sub>, 37°C条件下培养。分别将受试细胞按一定密度接种于96孔板内,24小时后给药组换成新的含被试药物的培养液 (药品先经DMSO溶解后,加入PBS稀释成1mg/ml浓度,使用时按所需浓度再稀释并加入细胞中)继续培养48小时。每孔加入预冷的50%三氯乙酸 (TCA, 最终浓度为10%) 50 $\mu\text{l}$ ,静置5分钟后移放置4°C 1小时,在自动洗板机上洗涤5次,空气干燥。加入100 $\mu\text{l}$  SRB液 (用1%醋酸配制成0.4%溶液) 染色10分钟,再置洗板机上用1%醋酸溶液洗涤4次,以除去未结合染料,空气干燥。最后用150 $\mu\text{l}$  10 mmol/L 非缓冲Tris溶液溶解结合的SRB,充分混匀后,用微孔板读数仪,在波长490nm处进行自动快速比色测定,

同时对数据进行处理。

表1 T12 和 taxol 作用六个肿瘤细胞系的 GI50 均值( $\mu$ g/ml)比较

细胞系	T	T8	T12	Taxol
Lu-06 (肺癌)	0.09	0.5	0.6	0.075
Bre-01(乳腺癌)	0.04	0.3	0.055	0.06
OV-01(卵巢癌)	0.006	0.06	0.02	0.05
Mel-08 (黑色素瘤)	0.02	0.25	0.09	0.07
Re-01 (肾癌)	0.03	0.25	0.06	1
Col-6(结肠癌)	0.02	0.1	0.03	0.007

本发明对六个肿瘤细胞系的作用结果以及与 T、T8 和紫杉醇的比较如表 1。本发明对六个肿瘤细胞均具有明显的抑制作用，其作用略低于 T，但明显高于 T8，抗肾癌作用显著高于紫杉醇；对结肠癌，卵巢癌、乳腺癌以及黑色素瘤细胞也显示很强的抑制作用。

### 实施例 3

贴壁生长细胞集落形成法测定 T12 对肿瘤克隆原细胞的抑制作用

克隆原细胞是指具有持续分裂能力的细胞。肿瘤的生长、转移和复发均以克隆原细胞的增殖为基础。当单个细胞连续分裂 6 代或以上时，可形成彼此不接触的集落群体，通过计数集落可定量分析克隆原细胞，是一种较灵敏的检测方法。集落形成测试方法如下所述：

取指数生长期贴壁 Re-01 细胞，经 Trypsin-EDTA 消化后制成单个分散细

胞悬液，进行活细胞计数，用RPMI1640培养基稀释细胞密度为500个/ml。取35 ml 培养皿，每三个一组，加入稀释后的细胞悬液，本发明以10倍稀释成五种不同浓度（0.001~10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）加入，同时设药物空白组。细胞与药物混匀后置含5%CO<sub>2</sub>的37°C温箱中培养14天。弃去培养液，常规Giemsa染色细胞并计数含50个细胞以上的集落。集落抑制率（%）=（1-给药组集落数 / 对照组集落数）× 100

以肾癌Re-01细胞系为材料，测定了T12对其集落形成的抑制作用，结果为：T12作用浓度为0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时，可完全抑制Re-01克隆原细胞的生长；作用浓度为0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和10.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，抑制率分别为85%和28%。

#### 实施例4

##### 人癌裸鼠异种移植物的实验治疗

以往通过多种小鼠模型发现的抗肿瘤药主要对恶性淋巴瘤和白血病有效，而且小鼠肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性高于人体肿瘤细胞。裸鼠具有胸腺依赖性功能缺乏，异种移植时无排斥反应。异种移植后的人体肿瘤在裸鼠体内仍保持其原有的组织形态及免疫学特征以及染色体组型和对抗肿瘤药物的原有敏感性。将人体恶性黑色素瘤细胞Mel-08接种裸鼠体内，异种移植方法如下所述：

药物配制：取相应量样品，加适量的吐温80助悬，以0.5%CMC-Na溶液配制成所需浓度的混悬液（每个剂量0.5 ml / 鼠）。

免疫功能缺陷裸鼠，体重17-19克，6-8周龄，均为雌性。试验组和阳性对照组均为6只，阴性对照组为12只。阳性对照药物为氮烯咪胺（DTIC），以生理盐水配制；阴性对照给以相应的溶剂。

试验的主要步骤：取生长旺盛的荷瘤动物，无菌条件下以匀浆法制备人体恶性黑色素瘤成细胞悬液，以相应宿主每鼠腋皮下接种0.2 ml / 只，次日按实验设计方案腹腔给药，连续十四天，4 mg / kg / 日。实验结束后解剖各组动物，剖取肿瘤称重，按下列公式计算肿瘤抑制率：肿瘤抑制率=[（对照组平均瘤重-给药组平均瘤重） / 对照组平均瘤重] × 100。

与药物未处理组比较，肿瘤生长明显受抑制，抑瘤率为50.17%，与已

经用于临床的阳性对照药物氮希咪胺（20mg/kg）的结果（抑瘤率为54.92%）接近。

## 实施例5

### T12诱导细胞凋亡的凝胶电泳检测

细胞凋亡对个体发育过程中细胞衰亡与更新、保持细胞数目的相对恒定方面起着重要作用。凋亡发生变化或异常，将导致人类疾病的产生。肿瘤过去被认为是增殖、分化异常疾病，随着对肿瘤细胞凋亡的研究，现认为肿瘤也是细胞凋亡异常的疾病。细胞凋亡异常打破了正常组织中细胞增殖与凋亡的平衡调节，导致细胞数目的不断增加，表现出生长优势，最终形成肿瘤。因此，可诱导肿瘤细胞凋亡的药物是治疗肿瘤的一条有效途径。

细胞凋亡的后期由于核酸酶的活化作用，使核染色质DNA降解，并产生不同长度（180-200bp）的寡聚核小体片段，通过琼脂糖电泳可观察到此特征。该特征是目前判断细胞凋亡发生的重要标志。应用琼脂糖电泳方法检测了以1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的T12作用人早幼粒白血病HL-60细胞后的DNA降解状况。操作步骤如下所述。

经本发明处理后的HL-60细胞约 $3 \times 10^6$ 用含2 mmol/L EDTA的PBS洗2次，加入0.3ml TBE缓冲液（Tris·HCl 50 mmol/L, pH 8.0, 含10 mmol/L EDTA），0.25% NP-40及Rnase A（终浓度为1%），混匀后，37°C温育30分钟；再加入proteinase K（终浓度为1mg/ml），37°C继续温育30分钟。取上清液15  $\mu\text{l}$ 加5  $\mu\text{l}$ 上样缓冲液，在1.5%琼脂糖凝胶上电泳，紫外光下观察结果并照相。

图1显示了T12处理与未处理的HL-60细胞的DNA降解状态。T12分别处理细胞4、12、24小时后，在1.5%的琼脂糖胶上出现清晰的DNA梯状条带（DNA降解标志，孔3-5），未经T12处理和经处理2小时的细胞未产生DNA梯状条带（孔1、2），表明T12可诱导肿瘤细胞凋亡。

## 实施例6

### 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期分布

细胞凋亡的某些特征也能够通过用流式细胞仪的检测反应出来，以此判定凋亡的发生，同时也是进行药物作用后细胞周期分布检测的可靠工具。流式细胞仪分析方法如下所述。

经本发明分别处理和未处理的Re-01和HL-60细胞 $2 \times 10^6$ ，分别于不同时间收集细胞，1000rpm / 分离心5分钟，去上清，沉淀用PBS洗涤两次，再以1: 9比例加入70%乙醇固定细胞，混匀后-20°C过夜。再次离心收集细胞，PBS洗涤两次，加入1ml 20 $\mu$ g / ml PI染色液（用40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 柠檬酸缓冲液，pH 7.8; 0.25mg / ml Rnase A），室温染色30分钟。在Epics Elite 流式细胞仪上（COULTER公司，US），以488nm激光为光源，检测红色荧光信号，结果分析软件为Elite 4.0和DNA Multicycle。

表2 T12 处理 HL-60 细胞不同时间的 DNA 含量分析（%）

处理时间(h)	0	2	4	8	24
Sub-G1	9.1	28.9	74.8	79.8	79.8

表3 T12 处理 Re-01 细胞不同时间的 DNA 含量分析（%）

处理时间(h)	0	12	24	48	72
Sub-G1	5.1	10.3	27.4	54.0	90.0

如表2、3所示，以T12（1 $\mu$ g/ml）分别HL-60细胞处理2小时，Re-01

细胞 12 小时即可诱导细胞出现 DNA 含量小于 2 倍体的亚 G1 凋亡峰，并随作用时间的延长亚 G1 凋亡峰含量增加。

表 4 T12 对 HL-60 细胞作用不同时间的细胞周期变化

作用时间(h)	G0/G1	S	G2/M
control	32.0	53.7	14.3
2	29.5	59.2	11.3
4	71.8	25.3	2.9

表 5 T12 对 Re-01 细胞作用不同时间的细胞周期变化

处理时间(h)	G0/G1	S	G2/M
control	28.4	60.6	11.0
24	38.1	36.9	25.0
48	40.7	43.3	16.0

从表 4、5 可以看出，未经药物处理的 HL-60 细胞和 Re-01 两种细胞大部分都处于 S 期，经 T12 分别处理不同时间后，可见细胞 G0/G1 期百分比增高，表明在 1 $\mu$ g/ml 浓度作用下，T12 可明显减少 S 期的细胞群体，而增加 G0/G1 期的细胞群体，其作用呈时间依赖性。

### 实施例7

本发明使凋亡相关蛋白酶活化并降解Bcl-2蛋白

细胞凋亡是受多因素调控的程序性死亡过程，许多癌基因、抑癌基因

参与了这一过程，如bcl-2。在T12对六个肿瘤细胞的生长抑制的分析中，我们发现，异常表达Bcl-2的癌细胞表现出对本发明的特异敏感性，GI50显著低于Bcl-2表达阴性或低水平表达的癌细胞（如表6所示）。

表 6 部分过度表达和低水平表达 Bcl-2 细胞的 GI50 比较

Bre-01*	Bre-07	Col-06*	Col-05	Mel-08*	Mel-05
0.055	0.3	0.03	0.2	0.07	0.25

“\*”表示高表达 Bcl-2 的细胞系（Western blot 检测）

因此推测T12诱导细胞凋亡的作用可能与bcl-2癌基因或其产物有关。为了证实这一推测，应用抗Bcl-2单抗并以异常表达Bcl-2的HL-60细胞为材料，进行蛋白免疫印迹反应，检测本发明作用后Bcl-2蛋白表达状态。方法所述如下。

经药物处理后的HL-60细胞 $1 \times 10^6$ ，离心后直接悬于样品处理液（20mmol/L Tris/HCl pH 8.0, 4%SDS, 30%甘油，10%β-巯基乙醇和适量溴酚蓝），用微量注射器反复抽吸，使细胞裂解，100℃煮沸3分钟，直接上样经12%SDS-PAGE分离，将凝胶转移至PVDF膜上，5%脱脂奶粉封闭过夜，加入抗Bcl-2单抗，作用2小时，洗膜后用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗孵育，化学发光法显色处理

图2所示为T12作用HL-60细胞24，48小时（孔4，5），与未处理细胞（孔6）比较，在蛋白印迹主带位置（p26）的下方，增加一条可与特异单抗反应的降解条带（相对分子量大约为20kDa）。同样浓度的T12处理Bre-01乳腺癌细胞48小时（孔7），也可获得相同的印迹反应结果。但本发明不诱导淋巴瘤Ly-01细胞Bcl-2发生降解（孔1，2）。Bcl-2蛋白降解可使Bcl-2失活并加速肿瘤细胞凋亡(Yamamoto AM et al, Leukemia 1998; 12: 1467)。Bcl-2的降解提示本发明诱导细胞凋亡过程引发了可降解Bcl-2的凋亡蛋白酶的激活。进一步比较了本发明与其先导化合物triptolide、T8和雷公藤多甙粉引发HL-60细胞凋亡蛋白活性升高的差异，检测了四种化合物在1 μg/

ml 处理浓度下,介导凋亡蛋白酶降解Bcl-2的强度,结果如图3:本发明(孔5)介导蛋白酶降解Bcl-2的强度明显高于其它三种化合物(孔1:对照,孔2-4分别为雷公藤多甙粉、T和T8)。

### 实施例8

#### 本发明与反义核苷酸的协同作用

反义核苷酸是90年代诞生的一种新型生物技术治疗药物,该药物特异地、选择性地攻击引起疾病的基因及其特定的碱基序列,从而阻断其活性和蛋白质的合成,最终达到治疗肿瘤的目的。癌基因bcl-2的高表达与多种人体肿瘤的发生和发展有关,其基因产物抑制肿瘤细胞的凋亡途径。反义核苷酸作用靶基因并使之失活,具有非常高的序列特异性,但对于已经生成的癌蛋白却束手无策。因此利用人工合成的bcl-2反义核苷酸(中国专利申请号:98 1 11872.0)作用异常表达Bcl-2的癌细胞,封闭其癌基因的表达即封闭基因产物Bcl-2的生成;再利用本发明可诱导凋亡相关蛋白酶激活的作用,使已经生成的Bcl-2蛋白降解,这种新颖的联合处理肿瘤细胞的方式,将为临床治疗肿瘤疾病提供新的思路。以结肠癌细胞Col-06为材料,先后用反义核苷酸和本发明处理。并以单独T12和单独反义作为对照,方法如下所述:

反义核苷酸体外处理采用将反义核苷酸,脂质体混和液用无血清1640按所需浓度稀释并处理细胞,37℃培养6小时,弃去旧培养液,用无血清1640洗涤一次后,加入含10%小牛血清的培养基,37℃5%CO<sub>2</sub>条件下继续培养至72小时;本发明组处理直接用含血清培养基稀释至所需浓度,作用细胞48小时;本发明联用反义核苷酸组则先经反义处理,24小时之后加入本发明,继续作用48小时。所有测试浓度包括药物空白细胞对照以及加药零时细胞对照均为三复孔。检测采用同实施例3相同的方法进行。

结果如图4所示。单独用本发明作用Col-06细胞,其GI<sub>50</sub>大约为0.04μg/ml,与反义联用处理细胞GI<sub>50</sub>小于0.001μg/ml,比T12单独作用降低了50倍以上。

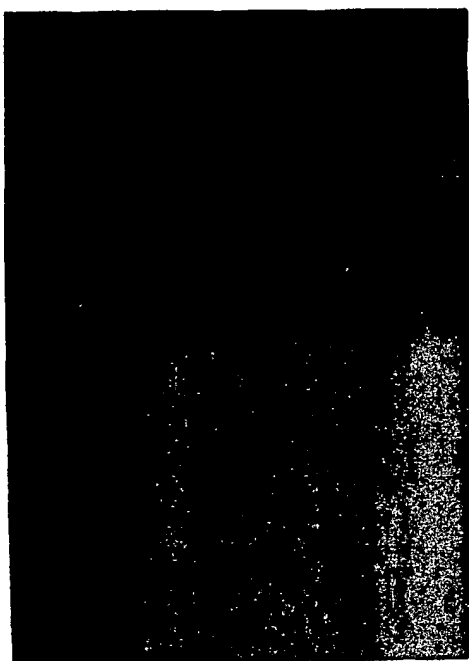


## 实施例9

### 本发明的急性毒性实验

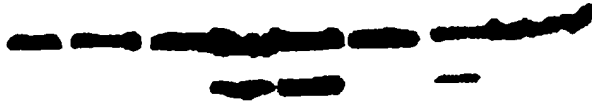
毒性实验是抗癌新药研究的重要环节，而小鼠是毒性研究中最常用的动物。本发明的毒性实验，采用昆明种小鼠腹腔注射单次给药，观察给药后动物产生的毒性反应，并测定其半数致死量。昆明种小鼠，体重： $20\pm 1$ 克，6周龄。室温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $65\pm 10\%$ 条件喂养，饲以标准全价营养颗粒饲料，自由摄食和饮水。试验设5个剂量组，剂量间距为0.8。动物随机分组，每组20只，雌雄各半。给药后观察即时反应，记录两周内小鼠的死亡分布，死亡小鼠及两周后存活小鼠进行解剖肉眼尸检，发现有病变组织时，对该组织进行镜检。试验结果以Bliss方法计算。

以腹腔注射单次给药对昆明种小鼠急性毒性试验的 $\text{LD}_{50}$ 值为： $74.42\text{ mg/kg}$ ，性别之间无显著性差异， $P$ 值 $>0.05$ 。先导化合物雷公藤内酯醇的 $\text{LD}_{50}$ 值为： $0.85\text{ mg/kg}$ 体重已有报导（Folkman J Nature Med 1995, 1: 27）。与此比较，本发明的毒性明显低于先导化合物T。



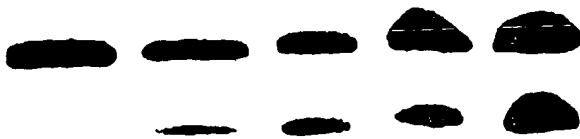
1 2 3 4 5

图 1



1 2 3 4 5 6 7 8 9

图 2



1 2 3 4 5

图 3

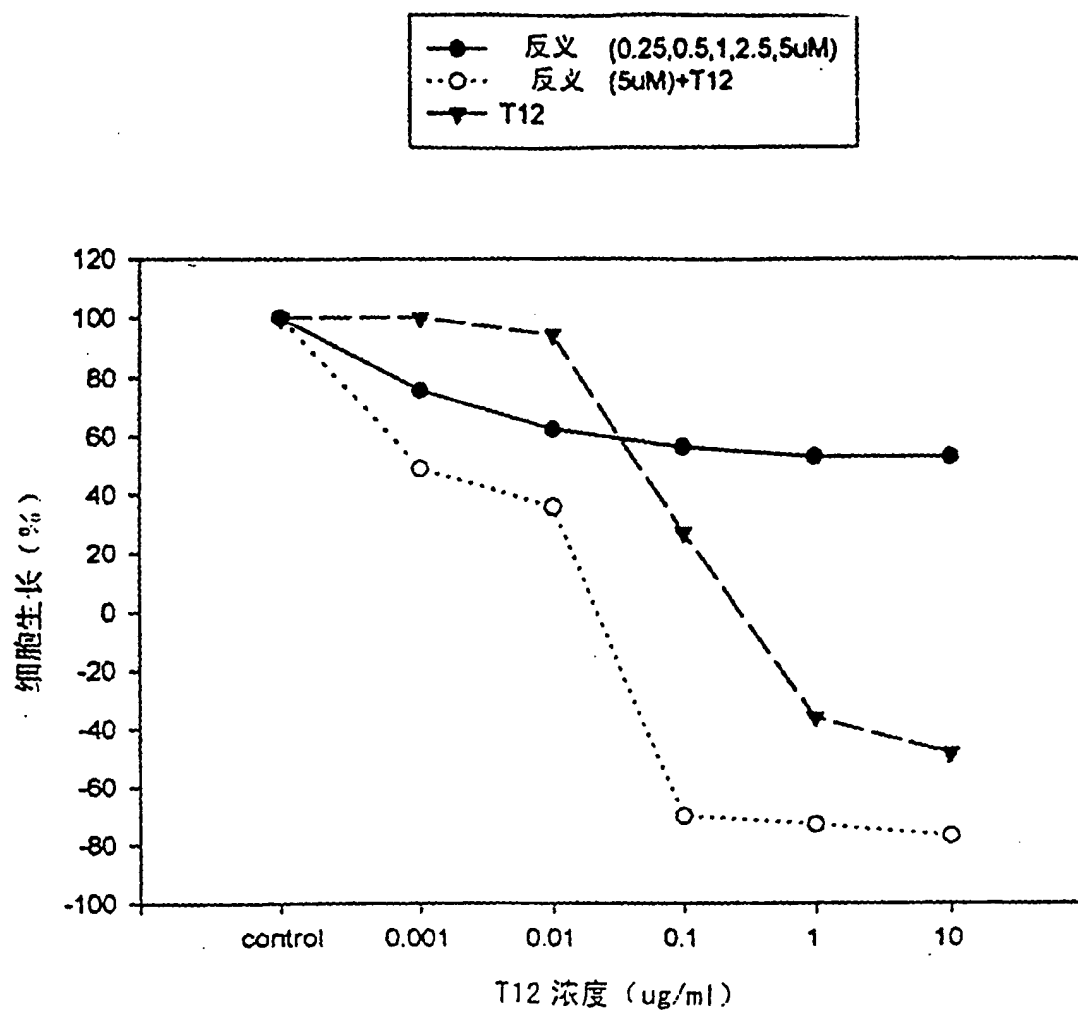


图 4